

**WO9803196**

Publication Title:

**INTRADERMAL BOVINE POLYNUCLEOTIDE VACCINE**

Abstract:

Abstract of WO9803196

A bovine polynucleotide vaccine formula including an intradermally effective amount of a plasmid consisting of a combination of a DNA sequence coding for a bovine pathogen immunogen and a promoter enabling in vivo expression of said immunogen in skin cells, is disclosed. Said vaccine formula is suitable for intradermal delivery by means of a liquid jet delivery apparatus. The portable bovine vaccination equipment includes a liquid jet delivery apparatus and a flask suitable for containing a plurality of doses of such a vaccine form e80 ula, and the delivery apparatus is designed to deliver a vaccine formula dose intradermally. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

**Best Available Copy**

*This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.*

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 11219-029-999  
SERIAL NUMBER: 10/679,038  
REFERENCE: **B31**

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : A61K 39/155, 39/265, A61D 7/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/03196 (43) Date de publication internationale: 29 janvier 1998 (29.01.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01322 (22) Date de dépôt international: 16 juillet 1997 (16.07.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/09402 19 juillet 1996 (19.07.96) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): MERIAL [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR). ID-DLO INSTITUTE OF ANIMAL SCIENCE AND HEALTH [NL/NL]; Edelhertweg 15, NL-8200 AB Lelystad (NL). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): RIJSEWIJK, Franciscus, Antonius, Maria [NL/NL]; Spiegelgracht 7, NL-1017 JP Amsterdam (NL). SCHRIJVER, Remco, Siebren [NL/NL]; Paltzerweg 54, NL-3722 JH Bilthoven (NL). VAN OIRSCHOT, Johannes, Theodorus [NL/NL]; Oostrandpark 18, NL-8212 AN Lelystad (NL). (74) Mandataire: COLOMBET, Alain; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.	
(54) Title: INTRADERMAL BOVINE POLYNUCLEOTIDE VACCINE (54) Titre: VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE BOVIN POUR VOIE INTRADERMIQUE (57) Abstract <p>A bovine polynucleotide vaccine formula including an intradermally effective amount of a plasmid consisting of a combination of a DNA sequence coding for a bovine pathogen immunogen and a promoter enabling <i>in vivo</i> expression of said immunogen in skin cells, is disclosed. Said vaccine formula is suitable for intradermal delivery by means of a liquid jet delivery apparatus. The portable bovine vaccination equipment includes a liquid jet delivery apparatus and a flask suitable for containing a plurality of doses of such a vaccine formula, and the delivery apparatus is designed to deliver a vaccine formula dose intradermally.</p> (57) Abrégé <p>La formule de vaccin bovin polynucléotidique comprend une quantité efficace par voie intradermique d'un plasmide associant une séquence d'ADN codant pour un immunogène d'un agent pathogène bovin et un promoteur permettant l'expression de cet immunogène <i>in vivo</i> dans les cellules de la peau, cette formule de vaccin étant adaptée à l'administration intradermique par un appareil d'administration par jet liquide. L'installation portable de vaccination bovine comprenant un appareil d'administration par jet liquide et un flacon adapté comprenant plusieurs doses d'une telle formule de vaccin, l'appareil d'administration étant conçu pour délivrer une dose de formule de vaccin en intradermique.</p>			

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CJ	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE BOVIN POUR VOIE INTRADERMIQUE**

La présente invention concerne un perfectionnement apporté à la vaccination des bovins.

5 L'immunisation et la vaccination par administration directe de séquences nucléotidiques codant pour une protéine immunogène (dite vaccination polynucleotidique ou par ADN) a été décrite dans la demande de brevet WO-A-90 11092. La protéine codée par la séquence nucléotidique insérée est  
10 susceptible d'être exprimée dans les cellules et d'entraîner le développement d'une réponse immunitaire. Cette demande prévoit l'utilisation d'ADN nu ainsi que d'ADN contenu dans des liposomes. De façon préférée, l'ADN est introduit dans le muscle. L'ADN pourrait aussi être introduit dans la peau, dans  
15 certains organes ou dans le sang, l'injection pouvant être réalisée de différentes manières telles que la voie intradermique, la voie transcutanée, la voie intraveineuse, etc.

Les travaux qui ont suivi les premières descriptions de  
20 cette technique ont démontré l'intérêt d'utiliser soit la voie intramusculaire pour l'injection de l'ADN, soit la méthode dite "gene gun" qui consiste à propulser des microparticules métalliques, telles que des microparticules d'or, revêtues de l'ADN directement dans les couches cellulaires superficielles  
25 de la peau.

J.B. ULMER et al., Science, Volume 259, 19 mars 1993, 1745-1749 ; G.J.M. COX et al., J. of Virology, Volume 67, n° 9, septembre 1993, 5664-5667 ; Z.Q. XIANG dans Virology 199, 132-140 (1994), ont décrit des essais de vaccination par ADN en  
30 utilisant la voie intramusculaire.

Il a également été largement démontré que la voie intramusculaire donnait des résultats supérieurs à la voie intradermique, mais que, en fin de compte, la voie la plus prometteuse était l'utilisation du "gene gun", car, avec cette  
35 technique, les doses administrées sont très inférieures aux doses nécessaires par voie intramusculaire. On peut se référer à F. FYNAN et al. dans P.N.A.S. USA Volume 90, 11478-11482, Décembre 1993, WO-A-95/20660.

De même D. TANG et al. (Nature 356, 152-154, 12 mars 1992) ont montré l'absence de réponse immunitaire après l'administration d'hormone de croissance humaine par voie intradermique à l'aide d'une aiguille hypodermique. Les auteurs  
5 ont en revanche démontré l'obtention d'une réponse immunitaire à l'aide de la technique du "gene gun".

Seuls E. RAZ et al. (P.N.A.S. USA, Vol. 91, 9519-9523, septembre 1994) ont rapporté que l'administration intradermique pouvait induire des titres en anticorps élevés.

10 De son côté, la technique du "gene gun" a l'inconvénient d'être difficile et coûteuse à mettre en oeuvre, puisqu'elle nécessite la préparation et l'utilisation de particules d'or revêtues de l'ADN et leur administration à l'aide d'un propulseur spécial.

15 Des auteurs ont donc développé une technique alternative qui prévoit l'utilisation d'un appareil d'administration par jet liquide. On peut citer P.A. FURTH et al. dans Analytical Biochemistry 205, 365-368, 1992 qui décrivent l'utilisation de l'appareil dénommé Ped-o-jet, qui est un injecteur utilisé pour  
20 délivrer des vaccins humains dans les tissus musculaires, pour l'administration d'un vaccin ADN. Les auteurs rapportent que l'injecteur peut faire passer l'ADN à travers la peau et atteindre les muscles, le tissu graisseux et le tissu mammaire des animaux vivants.

25 H.L. VAHLSING et al., dans Journal of Immunological Methods 75 (1994) 11-22, décrivent l'utilisation de l'appareil dénommé Med-E-Jet pour une administration transcutanée et intramusculaire.

30 On peut citer encore M. JENKINS et al., dans Vaccine 1995, Volume 13, n° 17, 1658-1664, qui décrivent l'utilisation de la vaccination par jet dans le muscle.

35 Le virus syncytial respiratoire bovin BRSV est présent dans le monde entier et peut causer des maladies sévères du tractus respiratoire inférieur chez les bovins, cette maladie étant similaire à celle causée par le virus respiratoire syncytial HRSV chez les enfants. Au cours d'une étude, il a été trouvé que plus de 95 % des veaux âgés de 2 ans étaient infectés par le virus BRSV (Van der Poel et al., Archives of

Virology 1993, 133, 309-321).

Le besoin en vaccin contre le virus BRSV est ressenti mais n'a pas donné lieu au développement de vaccins efficaces. Les premières tentatives de vaccination des enfants a conduit à l'apparition d'une facilitation de la maladie après infection naturelle, suggérant que la vaccination pouvait être dangereuse (Anderson et al., Journal of Infectious Diseases, 1995, 171 : 1 à 7). Il est connu cependant que des anticorps contre les deux glycoprotéines majeures de surface, (F protéine de fusion) et G (protéine d'attachement) pourraient jouer un rôle dans la protection (Kimman et Westenbrink, Archives of Virology, 1990, 112 : 1 à 25). De nombreux travaux ont également été menés sur des modèles d'animaux de type souris, chien, furet. En revanche, les essais de vaccination sur bovin avec la protéine F purifiée n'ont pas donné de résultat concluant, dans la mesure où comme chez les enfants vaccinés par HRSV, les veaux ont développé des anticorps neutralisants et des anticorps non neutralisants pouvant interférer avec la réponse immunitaire lors d'une infection ultérieure par le virus (L.D. Nelson et al., Am. J. Vet. Res., Vol. 53, n° 8, août 1992, p 1315-1321).

La présente invention a pour objectif de fournir un perfectionnement à la vaccination des bovins par ADN qui permette d'assurer une vaccination au moins aussi efficace que la vaccination par voie intramusculaire ou par la technique du "gene gun" mais qui soit de mise en oeuvre plus aisée et moins coûteuse.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un tel perfectionnement conduisant à une innocuité accrue, essentiellement en ce qui concerne les résidus de vaccination présents dans les tissus.

Un autre objectif de l'invention, qui regarde la vaccination des animaux destinés à la consommation, est d'assurer également une innocuité telle que la vaccination ne présente pas d'effets défavorables sur la présentation de la viande.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un moyen de vaccination de masse.

Un objectif spécifique de l'invention est de fournir un

tel vaccin permettant la protection des bovins contre le virus BRSV, le virus IBR, le virus BVD ou le virus PI-3.

Les demandeurs ont trouvé qu'il était possible de remplir ces objectifs en administrant le vaccin par voie intradermique à l'aide d'un injecteur liquide sans aiguille, assurant en 5 points une répartition du vaccin essentiellement dans l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Les essais conduits par les demandeurs dans le domaine de la vaccination des bovins contre le virus respiratoire syncytial bovin (Bovine Respiratory Syncytial Virus, BRSV) ont permis d'obtenir des résultats d'immunisation supérieurs par cette voie à ce qui est obtenu par la voie intramusculaire.

La présente invention propose pour la première fois la vaccination des bovins par des vaccins polynucléotidiques (ou vaccins ADN ou encore vaccins plasmidiques) conçus pour, et administrés par la voie intradermique au moyen d'un injecteur sans aiguille par jet liquide.

La présente invention a donc pour objet une formule de vaccin polynucléotidique comprenant une quantité efficace par voie intradermique d'un plasmide associant une séquence d'ADN codant pour un immunogène et un promoteur permettant l'expression de cet immunogène in vivo dans les cellules de la peau, cette formule de vaccin étant adaptée à l'administration intradermique (on vise en particulier les cellules de l'épiderme, du derme et de l'hypoderme ; l'administration vise en particulier à présenter les antigènes exprimés aux cellules dendritiques de Langerhans de la peau, lesquelles se localisent essentiellement dans l'épiderme) par un appareil d'administration intradermique par jet liquide, en particulier l'appareil dénommé Pigjet (fabriqué et distribué par Endoscoptic, Laons, France) ou un appareil équivalent délivrant le vaccin par une tête à 5 buses dans des conditions équivalentes au Pigjet. De manière générale, les formules de vaccin selon l'invention seront adaptées pour une administration par un appareil d'administratrion par jet liquide possédant de 1 à 10 buses, de préférence de 4 à 6, plus préférentiellement encore de 5 à 6.

Cela passe par un véhicule adapté à la voie intradermique,

tel que eau, tampon, eau physiologique, liposomes, lipides cationiques et en général véhicule de faible viscosité, notamment équivalente ou proche de celle de l'eau, et par un volume de dose utile et efficace par cette voie.

5           Notamment, mais pas exclusivement, avec un appareil ayant 5 ou 6 buses, c'est-à-dire administrant la dose par 5 ou 6 orifices et sous forme de 5 ou 6 jets de volumes identiques, le volume de dose pourra être avantageusement compris entre 0,1 ml et 0,9 ml, de préférence entre 0,2 et 0,6 ml, 10           préférentiellement de l'ordre de 0,4 à 0,5 ml.

La formule de vaccin comprendra une quantité de plasmide intradermiquement efficace qui sera en général de 10 ng à 1 mg, de préférence de 100 ng à 500 µg, préférentiellement de 0,5 µg à 50 µg de plasmide.

15           Typiquement, l'invention cherche à administrer la formule de vaccin en plusieurs points afin d'optimiser la transfection des cellules par les plasmides. Cela se traduit par une préférence pour l'usage d'une tête d'éjection à plusieurs trous. Cela peut aussi être combiné à une multi-application de 20           l'appareil, c'est-à-dire à la répartition de la dose vaccinale en plus d'une application de l'appareil en des endroits différents. De manière particulièrement préférée, on pourra utiliser un appareil à 5 ou 6 trous en mono-application ou en multi-application, de préférence en double-application.

25           Un cas typique de l'invention est une séquence d'ADN codant pour un immunogène du virus BRSV et en particulier pour le gène G et/ou F de ce virus (par exemple Souche 391-2 : R. Lerch et al. Virology. 1991. 181. 118-131).

Un autre cas typique de l'invention est une séquence d'ADN 30           codant pour un immunogène du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) ou herpèsvirus bovin (BHV), en particulier pour le gène gB et/ou le gène gD (par exemple Souche ST : Leung-Tack P. et al. Virology. 1994. 199. 409-421).

Un autre cas typique de l'invention est une séquence d'ADN 35           codant pour un immunogène du virus de la maladie des muqueuses (BVD), en particulier le gène E2 et/ou le gène E1 (par exemple Souche Osloss : L. De Moerlooze et al. J. Gen. Virol. 1993. 74. 1433-1438). On peut également associer des gènes de différents



sous-types de BVD, par exemple d'Amérique du Nord et d'Europe (A. Dekker et al., Veterinary Microbiol., 1995, 47, 317-329).

Un autre cas typique encore de l'invention est une séquence d'ADN codant pour un immunogène du virus parainfluenza de type 3 (PI-3), en particulier pour le gène HN et/ou le gène F, de préférence le gène HN (séquence des gènes F et HN déposée par H. Shibuta en 1987. N° d'accès de la séquence sur GenBank = Y00115).

En cas de combinaison de 2 gènes, par exemple F et G de BRSV, HN et F de PI-3 ou gD et gB d'IBR, les séquences correspondantes pourront être insérées dans le même plasmide ou dans des plasmides différents.

Par gène d'agent pathogène, on entend non seulement le gène complet, mais aussi les séquences nucléotidiques différentes, y compris fragments, conservant la capacité à induire une réponse protectrice. La notion de gène recouvre les séquences nucléotidiques équivalentes à celles décrites précisément dans les exemples, c'est-à-dire les séquences différentes mais codant pour la même protéine. Elle recouvre aussi les séquences nucléotidiques d'autres souches du pathogène considéré, assurant une protection croisée ou une protection spécifique de souche ou de groupe de souche. Elle recouvre encore les séquences nucléotidiques qui ont été modifiées pour faciliter l'expression in vivo par l'animal hôte mais codant pour la même protéine.

On comprend bien entendu que l'invention consiste en l'adaptation des vaccins ADN de l'art antérieur à une administration intradermique par un appareil d'administration par jet liquide. Si cela entraîne des modifications au niveau de la formule de vaccin et en particulier de la viscosité, de la quantité d'ADN et du volume de dose à administrer, il va de soi que l'invention s'applique par ailleurs à toutes les constructions de vaccin ADN décrites dans l'art antérieur. L'homme de l'art pourra donc se référer à l'état de l'art du domaine de la vaccination ADN et en particulier aux documents discutés plus haut.

De manière plus spécifique, les unités de transcription utilisées dans les formules de vaccin selon l'invention

comprendront un promoteur eucaryote fort, tel que le promoteur hCMV IE.

La formule de vaccin selon l'invention peut être conditionnée dans un flacon multi-doses, par exemple de 10 à 100 doses, adapté à un appareil d'administration intradermique par jet liquide, de préférence le Pigjet.

La présente invention a encore pour objet une installation portative de vaccination bovine comprenant un appareil d'administration par jet liquide et un flacon adapté comprenant plusieurs doses d'une formule de vaccin tel que décrit précédemment, l'appareil d'administration étant conçu pour délivrer une dose de formule de vaccin en intradermique.

De préférence, l'appareil d'administration comporte une tête d'éjection munie de 1 à 10 buses, notamment de 4 à 6, de préférence 5 ou 6.

L'appareil d'administration peut avoir les différentes caractéristiques données dans la description détaillée. Les appareils d'administration préférés sont ceux qui reproduisent les conditions d'administration obtenues avec l'appareil Pigjet.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un plasmide associant une séquence d'ADN codant pour un immunogène de pathogène bovin et un promoteur permettant l'expression de ce type d'immunogène, pour la préparation d'une formule de vaccin polynucléotidique selon les différents modalités décrites ci-dessus, adaptée à l'administration intradermique par un appareil d'administration par jet liquide.

L'invention a également pour objet une méthode de vaccination dans laquelle on administre par voie intradermique à l'aide d'un appareil d'administration par jet liquide, une formule de vaccin polynucléotidique telle que décrite ci-dessus. L'administration du vaccin peut s'effectuer par une ou plusieurs décharges d'un volume de formule déterminé. De même, il est possible de prévoir une ou plusieurs vaccinations réparties dans le temps.

La méthode de vaccination selon l'invention pourra reprendre les données citées plus haut en ce qui concerne notamment l'appareil d'administration à utiliser.

L'invention va être maintenant décrite plus en détails à l'aide de modes de réalisation de l'invention non limitatifs en se référant aux dessins annexés dans lesquels :

5 - la figure 1 décrit un plasmide comprenant le gène G du virus BRSV sous le contrôle du promoteur hCMV, pour la vaccination des bovins contre ce virus.

10 - la figure 2 représente un graphe comparant l'efficacité d'une vaccination contre le virus BRSV par voie intramusculaire IM (bovin 1349) et intradermique ID (bovins 1352 et 1353), avec les jours en abscisse et le titre infectieux en ordonnée.

#### Préparation du gène synthétique G de BRSV

15 Le virus syncytial respiratoire bovin est un Pneumovirus de la famille des Paramyxovirus. Il s'agit d'un virus enveloppé qui se réplique dans le cytoplasme et possède un ARN génomique simple brin en orientation négative. Le génome de BRSV code pour deux glycoprotéines transmembranaires majeures, la protéine de fusion F et la protéine d'attachement G.

20 On a réalisé une version synthétique du gène G en retirant de ce gène tous les signaux d'épissage potentiels (G. Keil, Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals, Friedrich Löffler Institute, D-17498, Insel Riems, Germany).

25 La région codant pour le gène G a été déterminée par Lerch et al., Journal of Virology, 1990, 64, 5559-5569). La région codante correspond à 257 acides aminés et à la caractéristique d'une glycoprotéine transmembranaire de type II. Elle possède un domaine cytoplasmique N-terminal de 40 acides aminés suivi d'une région transmembranaire de 25 acides aminés. Le restant, à savoir les 192 acides aminés C-terminaux, forment le domaine extra-cellulaire de la protéine G. On a synthétisé une séquence  
30 d'ADN ayant un cadre ouvert de lecture codant pour exactement les mêmes 257 acides aminés trouvés par Lerch et al, mais sans les signaux d'épissage potentiels. On a réalisé la traduction inverse de la séquence des 257 acides aminés en toutes les séquences d'ADN possibles codant pour une telle séquence  
35 d'acides aminés. Cela a été réalisé en utilisant le programme de traduction inverse d'une séquence de protéine RTRANS de PCGene de A. Bairoch., Université de Genève, Suisse (IntelliGenetics Inc). On a déterminé les sites potentiels

d'épissage en utilisant le programme d'analyse d'acide nucléique "Signal". Ce programme est basé sur la méthode de la matrice pondérée de Staden (1984, Nucleic Acids Research 12, 505-519). Ce programme identifie les sites donneurs potentiels d'épissage (bordures intron/exon) et les sites accepteurs potentiels d'épissage (bordures exon/intron). A l'aide de ces données de séquence, on a pu muter l'ensemble des signaux d'épissage forts potentiels sans modifier la capacité pour la protéine. En particulier, les dinucléotides GT qui peuvent former l'extrémité 5' d'un intron et les dinucléotides AG qui peuvent former l'extrémité 3' d'un intron ont été retirés lorsque cela était possible.

Pour synthétiser la séquence de nucléotidiques adaptée codant pour G, on a synthétisé des oligonucléotides d'environ 100 résidus couvrant les deux brins de la séquence complète, à l'aide d'un synthétiseur d'ADN (par exemple synthétiseur d'ADN, Perkin, Elmers/Applied Biosystems 381A ; on peut également utiliser les oligonucléotides commercialement disponibles). Les oligonucléotides complémentaires sont hybridés pour former un fragment double brin et clonés dans des vecteurs procaryotes tels que pUC18 ou pUC19. En utilisant des sites de restriction enzymatique appropriés, on lie ensemble les fragments d'ADN clonés dans le bon ordre en utilisant les procédures de clonage standard (Sambrook et al., Molecular Cloning : A laboratory Manual, 2ème édition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York 1989). La séquence nucléotidique du fragment d'ADN qui en résulte a été déterminée à l'aide des procédures de séquençage standard (Sambrook et al.) pour contrôler que la séquence est correcte.

**Construction du vecteur d'expression eucaryote comprenant le gène G derrière le promoteur hCMV.**

Pour assurer son expression, le gène synthétique G a été cloné dans un vecteur. Dans cet essai préliminaire, on a utilisé un vecteur immédiatement disponible au laboratoire, à savoir le vecteur d'expression eucaryote 175hCMV. Ce vecteur plasmidique contient deux fragments provenant du virus BHV1 qui flanquaient à l'origine la glycoprotéine E de la souche

BHVI hollandaise appelée Lam (Van Engelenburg et al., 1994, Journal of General Virology 75, 2311-2318). Le fragment flanquant gauche (Cterm gI) commence au site PstI situé dans le cadre de lecture ouvert de la glycoprotéine gI et se termine au site BstBI (ou AsuII), 17 nucléotides en amont du début (start) du cadre ouvert de lecture du gène gE. Ce fragment est indiqué par : Cterm gI. Le fragment flanquant droit commence au site EcoNI situé au niveau du codon stop du cadre ouvert de lecture gE et se termine au niveau du premier site SmaI amont dans le fragment de répétition terminal (TR). Ce fragment code pour le gène US9. Ce fragment est indiqué par : US9 et TR. Ces deux fragments ont été clonés dans le site PstI et le site EcoRI (bout franc) de pUC18. Entre le site BstBI et le site EcoNI, un fragment AseI (bout franc) de 720 pb contenant la plus grande partie du promoteur Immediate Early du cytomégalovirus humain (hCMV-P) a été cloné avec une région polylinker et se terminant avec un signal de polyadénylation (Poly A). Le gène G synthétique a été cloné dans l'orientation indiquée à l'intérieur du site SmaI de cette région polylinker. Le plasmide obtenu a été appelé PR608. Voir la figure 1.

**Contrôle de l'expression in vitro de G à partir du plasmide PR608 :**

On a réalisé un essai d'expression transitoire afin de tester si le plasmide PR608 peut exprimer la protéine G. Pour cet essai, 1,5 µg d'ADN purifié de plasmide PR608 a été transfecté dans une monocouche de cellules de trachée embryonnaire bovine (EBTr) en culture. Ces cellules EBTr ont été cultivées dans du milieu essentiel minimal de Earle avec 10 % de sérum bovin foetal (Integro) et des antibiotiques [125 UI de pénicilline (Gist-Brocades), 125 µg de streptomycine (Biochemie), 37,5 UI de nystatin (Sigma) et 37,5 µg de kanamycine (Sigma) par ml]. La transfection a été réalisée conformément à la méthode standard de précipitation au phosphate de calcium selon F.L. Graham et A.J. van der Eb (1973, Virology 52, 456-467). Après transfection, l'ADN plasmidique est transporté dans le noyau des cellules transfectées et les protéines codées sont exprimées grâce au

mécanisme de la cellule hôte. Normalement, seulement de 0,01 % à 0,1 % des cellules de la monocouche transfectée vont internaliser l'ADN et exprimer les gènes codés.

5     Préparation de l'ADN pour la vaccination polynucléotidique:

10     L'ADN du plasmide PR608 a été préparé en ajoutant 100 µl d'un stock d'E. coli K12 dans le glycérol, cellules DH5alpha F-comprenant le plasmide PR608 à 2 litres de milieu LB, qui est un milieu standard pour la croissance des bactéries. Cette culture de 2 litres est incubée à 37°C pendant 20 heures et les cellules amplifiées sont récoltées en utilisant des flacons de 250 ml et une centrifugeuse IEC Centra-8R à vitesse maximale. L'ADN du plasmide PR608 a été isolé des cellules du culot en suivant la méthode de lyse alcaline standard de Birnboim et Doly telle que décrite par Sambrook et al., (1989, Molecular Cloning, a Press Laboratory Manual, 2ème Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press). L'ADN du plasmide isolé a été ensuite dissous dans 20 ml de TE (10 mM Tris et 1 mM EDTA, pH 7,4) et soumis à une électrophorèse pour déterminer la concentration d'ADN et pour estimer la qualité de l'ADN. A partir d'une culture normale de 2 litres, on peut isoler 40 mg de plasmides; environ 60 % du plasmide PR608 se trouve dans l'état super enroulé et environ 30 % et dans l'état circulaire relâché.

25     La préparation de plasmides est stockée à - 20°C. Avant application de l'ADN de plasmide PR608, la solution d'ADN est diluée à 0,5 mg/ml dans 1 x PBS et TE. Cette solution d'ADN tamponnée est pipetée dans des flacons de 10 ml adaptés à l'appareil Pigjet et stockés à 4°C pour une utilisation dans les 1 à 2 heures.

30     Appareil d'administration Pigjet

35     L'appareil d'administration de type portatif, de type Pigjet, comprend dans un boîtier muni d'une poignée, une chambre calibrée à 0,2 ml et un piston maintenu normalement en position rentrée dans la chambre par un ressort solidaire dudit piston.

      L'appareil comporte en outre une tête à 5 gicleurs ou buses, destinés à calibrer le jet, soit une tête à 1 gicleur et un dispositif de filtration pour éviter l'injection

d'éventuelles impuretés. Les gicleurs sont légèrement écartés les uns des autres.

La poussée du jet à la sortie du gicleur peut être fixée à 100 bars pour le Pigjet à 1 gicleur.

5 Provoquée par un moyen approprié, la compression du ressort provoque le déplacement du piston et donc l'aspiration de la dose de vaccin à partir d'un réservoir ou flacon adapté, fixé sur le boîtier.

10 La libération du ressort provoque la rentrée du piston et l'éjection de la dose par la ou les buses.

**Essais de vaccination et d'épreuve :**

15 4 veaux exempts d'organismes pathogènes spécifiques ont été obtenus par césarienne, ont été privés de colostrum et élevés à l'isolement. Les veaux ont été vaccinés 6 fois à 1 semaine d'intervalle, à partir de l'âge de 6 semaines. 2 animaux ont été vaccinés par voie intradermique au moyen du Pigjet à 1 gicleur (Endoscopic, Laons, France) et 2 animaux ont été vaccinés par voie intramusculaire avec aiguille calibrée 25. Le Pigjet est appliqué de façon que sa tête soit  
20 au contact de la peau et perpendiculaire à celle-ci, afin que le jet de vaccin ait une direction orthogonale à la peau. Chaque vaccination a consisté en 500 µg d'ADN de plasmide dans 1 ml de tampon phosphate PBS. Les vaccinations intradermiques ont consisté en 5 injections de 0,2 ml dans la peau de la patte postérieure et les vaccinations intramusculaires ont consisté  
25 en 1 injection dans le muscle gluteus. La peau a été rasée avant vaccination.

On a obtenu les titres en anticorps qui apparaissent dans le tableau I suivant :

- 30
- vaccination aux semaines 0, 1, 2, 3, 4, 5
  - épreuve à la semaine 6
  - suivi du titre en anticorps aux semaines 0 à 8

		0	1	2	3	4	5	6	7	8
	veau 1352 Pigjet	<5	<5	<5	80	640	1280	640	1280	>5120
5	veau 1453 Pigjet	<5	<5	<5	40	1280	640	640	640	<sup>a</sup>
	veau 1349 IM	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	veau 1350 IM	<5	<5	<5	<sup>a</sup>					

10 a : ces veaux ont été sacrifiés en raison de l'apparition de problèmes de santé importants, non associés aux vaccinations.

Suite aux injections d'ADN, on observe l'apparition d'anticorps au bout de 3 semaines chez les animaux vaccinés par voie ID et de hauts titres à partir de la semaine 4 s'établissant en plateau.

15 Les veaux ont été ensuite éprouvés à l'aide de virus BRSV infectieux. L'inoculation du virus a été réalisée 6 semaines après la première vaccination par instillation intranasale d'1 ml de virus de souche Odijk ( $10^{3.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml) dans chaque naseau.

20 Pour estimer l'efficacité de la vaccination, on a suivi l'excrétion de virus par le titre infectieux TCID<sub>50</sub>/ml jusqu'à 12 jours après l'infection, sur des écouvillons nasopharyngés (sw) et dans du fluide de lavage (Lav) des poumons (Figure 2).

25 On a pu démontrer qu'un plasmide codant pour la protéine G de BRSV administré par voie intradermique par jet liquide protégeait contre une épreuve virulente par ce virus. La vaccination intradermique à l'aide d'un appareil d'administration ayant une tête d'éjection à 1 trou, induit rapidement des titres en anticorps élevés contre la protéine G, ce qui n'a pas été observé par la vaccination intramusculaire.

30 En outre, les titrages de virus BRSV infectieux dans les fluides de lavage des poumons et sur les écouvillons nasopharyngés étaient élevés pour les veaux vaccinés par voie intramusculaire et virtuellement absents chez les veaux vaccinés par voie intradermique. Les signes cliniques étaient  
35 légers et ne différaient pas de manière marquée entre les animaux.

On a également remarqué une très bonne innocuité lorsqu'on utilisait le Pigjet, cette technique ne nécessitant d'ailleurs



pas d'induire une inflammation préalable du tissu comme c'est le cas avec les particules d'or.

En outre, ce qui est remarquable, c'est l'obtention d'une protection avec la protéine G qui, à l'ordinaire n'est pas très immunogène (P.L. Collins dans : The Paramyxoviruses, 1991, Ed. D.W. Kingsbury, New-York, Plenum Press) et le titre élevé en anticorps obtenu après vaccination intradermique est comparable à celui obtenu après infection naturelle ou vaccination avec un vaccin vivant testé par ailleurs.

L'invention concerne aussi la méthode de préparation des formules de vaccin telle qu'elle ressort de cette description.

15

20

25

30

35

REVENDEICATIONS

1. Formule de vaccin polynucleotidique destiné au bovin comprenant une quantité efficace par voie intradermique d'un  
5 plasmide associant une séquence d'ADN codant pour un immunogène d'un agent pathogène bovin et un promoteur permettant l'expression de cet immunogène in vivo dans les cellules de la peau, cette formule de vaccin étant adaptée à l'administration intradermique par un appareil d'administration par jet liquide.
- 10 2. Formule de vaccin selon la revendication 1, caractérisée en ce que le plasmide est présenté dans un véhicule adapté à la voie intradermique sous un volume de dose compris entre 0,1 et 0,9 ml, de préférence entre 0,2 et 0,6 ml, plus préférentiellement entre 0,4 et 0,5 ml, apte à être  
15 administré par jet liquide en intradermique.
3. Formule de vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le plasmide est présent dans la formule de vaccin en une quantité intradermiquement efficace de 10 ng à 1 mg, de préférence de 100 ng à 500 µg, plus  
20 préférentiellement de 0,5 µg à 50 µg.
4. Formule de vaccin selon la revendication 3, caractérisée en ce que la séquence d'ADN code pour un immunogène d'un agent pathogène choisi parmi le groupe consistant en : virus BRSV, virus IBR, virus BVD et virus PI 3.
- 25 5. Formule de vaccin selon la revendication 4, caractérisée en ce que la séquence d'ADN code pour le gène gB et/ou le gène gD du virus IBR.
6. Formule de vaccin selon la revendication 4, caractérisée en ce que la séquence d'ADN code pour le gène G et/ou F du virus BRSV.
- 30 7. Formule de vaccin selon la revendication 4, caractérisée en ce que la séquence d'ADN code pour E2 et/ou E1 du virus BVD.
8. Formule de vaccin selon la revendication 4, caractérisée en ce que la séquence d'ADN code pour HN et/ou F du virus PI 3.
- 35 9. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le promoteur est

un promoteur eucaryote fort, tel que le promoteur hCMV IE.

10. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle est conditionnée dans un flacon multi-doses adapté à un appareil d'administration intradermique par jet liquide, de préférence le Pigjet.

11. Installation portative de vaccination bovine comprenant un appareil d'administration par jet liquide et un flacon adapté comprenant plusieurs doses d'une formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, l'appareil d'administration étant conçu pour délivrer une dose de formule de vaccin en intradermique.

12. Installation selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'appareil comporte une tête d'éjection munie de 1 à 10 buses, notamment de 4 à 6, de préférence 5 ou 6.

13. Utilisation d'un plasmide associant une séquence d'ADN codant pour un immunogène bovin et un promoteur permettant l'expression de cet immunogène, pour la préparation d'une formule de vaccin polynucléotidique adaptée à l'administration intradermique par un appareil d'administration par jet liquide.

14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comporte entre 10 ng et 1 mg d'ADN, de préférence entre 100 ng et 500 µg, de préférence entre 0,5 µg et 50 µg, sous un volume de dose compris entre 0,1 et 0,9 ml, de préférence entre 0,2 et 0,6 ml, plus préférentiellement entre 0,4 et 0,5 ml.

15. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que la séquence d'ADN code pour un immunogène d'un agent pathogène choisi parmi le groupe consistant en :  
virus BRSV, IBR, BVD, PI 3.

p608

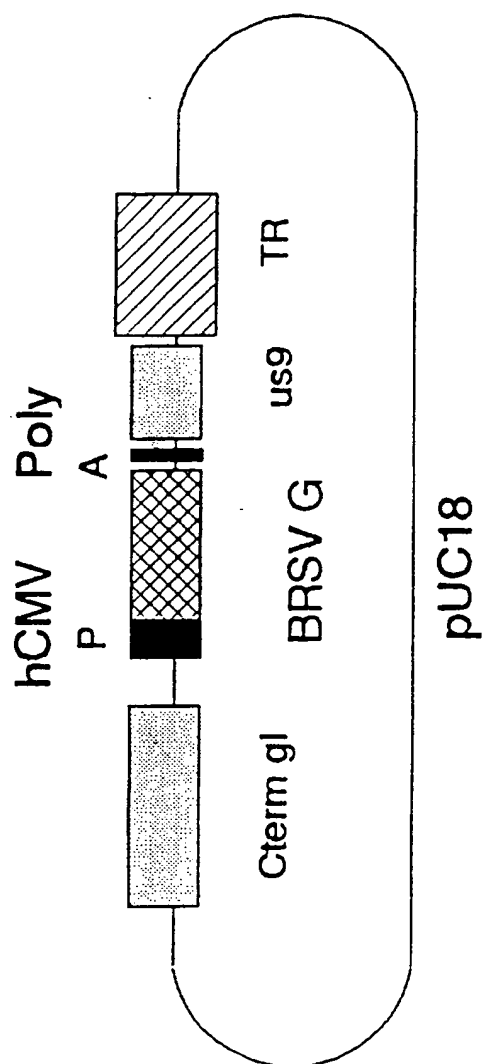
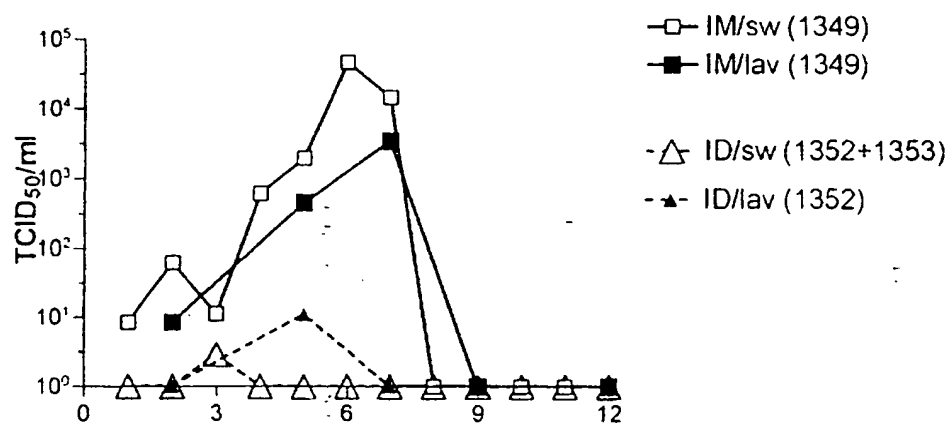


FIGURE 1

2/2

Figure 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter: 1al Application No  
PCT/FR 97/01322

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 A61K39/155 A61K39/265 A61D7/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K C07K A61D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RAZ E. ET AL.: "Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, no. 20, 27 September 1994, WASHINGTON US, pages 9519-9523, XP002028211 cited in the application see the whole document	1-4
X	WO 95 20660 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER) 3 August 1995 cited in the application see the whole document	1-4
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search - 6 November 1997		Date of mailing of the international search report 19/11/1997
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreau, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/01322

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FURTH P.A. ET AL.: "Gene Transfer into Somatic Tissues by Jet Injection" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 205, 1992, NEW YORK US, pages 365-368, XP000647725 cited in the application see the whole document ---	1-15
A	VAHLSING H.L. ET AL.: "Immunization with plasmid DNA using a pneumatic gun" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 175, 1994, NEW YORK US, pages 11-22, XP002028212 cited in the application see the whole document ---	1-15
A	WO 92 01471 A (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 6 February 1992 see the whole document ---	1-15
A	FR 2 348 709 A (PISTOR M.) 18 November 1977 see the whole document -----	1-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01322

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A	03-08-95
		EP 0740704 A	06-11-96
		US 5620896 A	15-04-97
-----			
WO 9201471 A	06-02-92	AU 650040 B	09-06-94
		AU 8330391 A	18-02-92
		CA 2087853 A	25-01-92
		EP 0540645 A	12-05-93
		HU 67362 A	28-03-95
		JP 5509231 T	22-12-93
		NZ 239084 A	27-09-94
FR 2348709 A	18-11-77	NZ 250402 A	28-08-95
		AU 2438977 A	26-10-78
		BR 7702565 A	29-11-77
		CA 1108026 A	01-09-81
		DD 132169 A	06-09-78
		DE 2716784 A	03-11-77
		GB 1576733 A	15-10-80
		JP 52131684 A	04-11-77
		US 4108177 A	22-08-78
-----			



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No  
PCT/FR 97/01322

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 A61K39/155 A61K39/265 A61D7/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 A61K C07K A61D		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	RAZ E. ET AL.: "Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, no. 20, 27 septembre 1994, WASHINGTON US, pages 9519-9523, XP002028211 cité dans la demande voir le document en entier	1-4
X	WO 95 20660 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER) 3 août 1995 cité dans la demande voir le document en entier	1-4
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
<b>Categories spéciales de documents cités:</b>		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (celle qu'indique) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  6 novembre 1997		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  19/11/1997
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Moreau, J

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demi internationale No

PCT/FR 97/01322

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FURTH P.A. ET AL.: "Gene Transfer into Somatic Tissues by Jet Injection" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 205, 1992, NEW YORK US, pages 365-368, XP000647725 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-15
A	VAHLSING H.L. ET AL.: "Immunization with plasmid DNA using a pneumatic gun" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 175, 1994, NEW YORK US, pages 11-22, XP002028212 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-15
A	WO 92 01471 A (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 6 février 1992 voir le document en entier ---	1-15
A	FR 2 348 709 A (PISTOR M.) 18 novembre 1977 voir le document en entier -----	1-15

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/FR 97/01322

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A	03-08-95
		EP 0740704 A	06-11-96
		US 5620896 A	15-04-97
WO 9201471 A	06-02-92	AU 650040 B	09-06-94
		AU 8330391 A	18-02-92
		CA 2087853 A	25-01-92
		EP 0540645 A	12-05-93
		HU 67362 A	28-03-95
		JP 5509231 T	22-12-93
		NZ 239084 A	27-09-94
		NZ 250402 A	28-08-95
FR 2348709 A	18-11-77	AU 2438977 A	26-10-78
		BR 7702565 A	29-11-77
		CA 1108026 A	01-09-81
		DD 132169 A	06-09-78
		DE 2716784 A	03-11-77
		GB 1576733 A	15-10-80
		JP 52131684 A	04-11-77
		US 4108177 A	22-08-78

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**